ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT

# MANUEL DES METHODES DE LA RECHERCHE SUR L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE

## Septième partie - Biocessais sélectionnés pour la Méditerranée (Tests utilisés dans le Projet commun coordonné FAO (COPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée)

par

G. Bellan*
(Expert conseil)
Division des ressources halieutiques et de l'Environnement
Département des Pêches
Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
Rome, Italie

avec la collaboration de
L. Dalla Venezia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Venezia
et de
G. Stora, Centre national de la Recherche scientifique, Endoume, Marseille.

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE
Rome, 1981

Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et du Programme des Nations Unies pour l'environnement aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites

M-45

ISBN 92-5-201085-8

Reproduction interdite, en tout ou en partie, par quelque procédé que ce soit, sans l'autorisation écrite de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, détentrice des droits avec le Programme des Nations Unies pour l'environnement. Adresser une demande motivée au Directeur de la Division des publications, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Via delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie, en indiquant les passages ou illustrations en cause.

© FAO et PNUE 1981

## PREPARATION DU PRESENT MANUEL

Le présent manuel a été préparé dans le cadre d'un projet commun du Programme des Nations Unies pour l'environnement et de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, intitulé "Projet commun coordonné FAO (CGPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée".

DEFINITION DE POLLUTION DU MILIEU MARIN

On entend par pollution du milieu marin: "L'introduction, directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie dans le milieu marin (y compris les estuaires) lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommage aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entrave aux activités maritimes, y compris la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et dégradation de valeurs d'agrément."

Groupe mixte d'experts OCMI/FAO/Unesco/OMM/OMS/AIEA/ONU/-PNUE chargé d'étudier les aspects scientifiques de la pollution des mers (GESAMP)

* adresse actuelle de l'auteur:
Station marine d'Endoume, CNRS
Rue de la Batterie des Lions
13007 Marseille, France

Distribution:

FAO Département des Pêches
FAO Fonctionnaires régionaux des pêches
Projet "pollution en Méditerranée"
Sélecteur SM
PNUE

La référence bibliographique de ce document doit être donnée ainsi:

Bellan, G., 1981 Manuel des méthodes de la recherche sur l'environnement aquatique. Septième partie. Bioessais sélectionnés pour la Méditerranée (Tests utilisés dans le Projet commun coordonné FAO (CGPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée). FAO Doc.Tech. Pêches, (208): 37 p.

FAO manuals. Marine Pollution. Pollution monitoring. Mediterranean Sea. Methodology. Bioassays. Toxicity tests.

# PREFACE

Le programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution en Méditerranée a été créé dans le cadre du Plan d'Action pour la Méditerranée (MAP) élaboré par le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) et approuvé par la Conférence des plénipotentiaires des Etats côtiers de la région méditerranéenne sur la protection de la mer Méditerranée (Barcelone, 28 janvier-4 février 1975). Un projet commun coordonné FAO (CGPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée a été entrepris au titre de ce programme. Ledit projet vise à organiser des études de base, et notamment à étudier l'impact de polluants divers sur des organismes et leurs populations.

Le document opérationnel, qui sert de programme-cadre aux fins de la collaboration des laboratoires méditerranéens en matière d'études de base et de surveillance continue de ces agents polluants, a été élaboré lors de la Consultation d'experts FAO (CGPM)/PNUE relative au projet commun coordonné sur la pollution en Méditerranée, réunie par la FAO (CGPM) à Rome du 23 juin au 4 juillet 1975. Le rapport de cette Consultation précise quels organismes et agents polluants doivent être surveillés de façon continue. Il précise de même que l'action de ces polluants sur ces organismes doit être étudiée à l'aide de bioessais.

A la demande de la Consultation d'experts à mi-projet (Dubrovnik, mai 1977), le présent Manuel a été préparé pour préciser les procédures générales de ces bioessais. Il a pour but de présenter, de manière aussi précise et simple que possible, quelques types de bioessais directement utilisables par l'ensemble des laboratoires méditerranéens travaillant dans le cadre du projet pilote: "Recherches relatives aux effets des polluants sur les organismes marins et leurs populations" (MED POL IV). Le but essentiel de ce Manuel est de décrire quelques méthodes permettant d'évaluer les effets de polluants, essentiellement chimiques, sur les organismes marins. Il se veut résolument pratique et il ne fera appel à des notions théoriques qu'à titre de rappel de connaissances supposées déjà connues des utilisateurs. Ce Manuel se propose d'aider les laboratoires en faisant office de guide en matière de choix d'espèces, de préparation des bioessais et de procédures normalisées de réalisation de ceux-ci. Les polluants choisis (et leurs concentrations) ne le sont, bien entendu, qu'à titre d'exemple. De la sorte, on peut envisager d'améliorer les possibilités de comparaison des résultats obtenus par les différents laboratoires.

Il est très vivement recommandé de se reporter aussi au "Manuel des méthodes de recherche sur l'environnement aquatique. Quatrième partie: Principes de sélection des tests biologiques pour l'évaluation de la pollution marine" (FAO Doc.Tech.Pêches (164), FIRI/T164, Rome 1981).

On s'attend à ce qu'au cours de l'utilisation du Manuel, des observations et propositions d'amélioration parviennent à la FAO. Ces commentaires et le développement futur des tests, serviront de base dans la préparation de méthodes de référence pour les études sur la pollution en mer Méditerranée.

L'auteur tient tout particulièrement à remercier M. R. Establier, Instituto de Investigaciones Pesqueras, Cadix, pour sa collaboration amicale pendant la rédaction du Manuel. Il remercie aussi M. L. Saliba, University of Malta, pour ses remarques constructives.

Les opinions exprimées dans le Manuel sont celles de l'auteur et ne représentent pas nécessairement les vues de la FAO ou du PNUE.

RESUME

Dans le cadre d'un projet commun coordonné FAO (COPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée, une série de bioessais sélectionnés ont été mis au point. Après un bref rappel des sources et effets de la pollution marine, on a présenté les buts des tests ainsi que les différentes procédures nécessaires à l'acquisition de résultats sûrs. Des tests à court et à long terme avec différents organismes (Polychètes, Mollusques, Crustacés, Poissons) ont été minutieusement décrits et les protocoles expérimentaux ont été détaillés pour être suivis pas à pas. Deux méthodes statistiques permettant l'évaluation des résultats ont été proposées.

# TABLE DES MATIERES


| | | Page |
|---|---|---|
| 1. | BREF RAPPEL DES SOURCES ET EFFETS DE LA POLLUTION MARINE | 1 |
| | 1.1 Sources | 1 |
| | 1.2 Effets | 1 |
| 2. | MOTIVATIONS ET BUTS DES TESTS | 1 |
| | 2.1 Tests généraux | 2 |
| | 2.2 Tests légaux | 2 |
| | 2.3 Tests pour l'établissement de critères de qualité des eaux et de surveillance continue des effluents | 2 |
| | 2.4 Tests de protection des niveaux trophiques supérieurs | 2 |
| | 2.5 Tests de biostimulation | 3 |
| | 2.6 Tests divers | 3 |
| 3. | TYPES DE PROCEDURES | 3 |
| | 3.1 Données générales | 3 |
| | 3.1.1 Tests à réponse directe | 3 |
| | 3.1.2 Tests à réponse indirecte | 4 |
| | 3.2 Procédures expérimentales (protocoles expérimentaux) | 5 |
| | 3.2.1 Sélection des organismes | 5 |
| | 3.2.2 Récolte et maintien en vie des espèces choisies | 5 |
| | 3.2.3 Laboratoire d'expérience | 6 |
| | 3.2.4 Milieu expérimental | 7 |
| | 3.2.5 Matériel expérimental | 8 |
| | 3.2.6 Introduction des polluants | 10 |
| 4. | LES TESTS | 12 |
| | 4.1 Test à court terme avec Capitella capitata | 12 |
| | 4.2 Test à long terme avec Capitella capitata (Reish et al., 1978) | 14 |
| | 4.3 Test de mortalité à court terme avec la moule Mytilus galloprovincialis | 17 |
| | 4.4 Test de mortalité à court terme avec Tisbe bulbisetosa | 19 |
| | 4.5 Test à long terme avec Tisbe bulbisetosa | 21 |
| | 4.6 Test de mortalité à court terme avec l'isopode Idotea baltica basteri | 23 |
| | 4.7 Test de mortalité à court terme avec la crevette Palaemon elegans | 25 |
| | 4.8 Test de mortalité à court terme avec le poisson Mugil auratus | 27 |
| 5. | EVALUATION ET PRESENTATION DES RESULTATS | 29 |
| | 5.1 La méthode de Bliss | 29 |
| | 5.1.1 Calcul | 30 |
| | 5.2 Test de Kolmogoroff-Smirnov | 35 |
| 6. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 36 |

## 1. BREF RAPPEL DES SOURCES ET EFFETS DE LA POLLUTION MARINE

### 1.1 Sources *

- Sources fixes

Le rejet se produit toujours au même endroit (exemple: rejets domestiques urbains, égouts industriels). On peut distinguer les décharges continues et les décharges discontinues.

- Sources de localisations variables

Les décharges continues ou presque continues ne sont pas fondamentalement différentes des précédentes, si ce n'est que le point de la décharge varie de temps à autre, dans une aire géographique plus ou moins vaste.

Les décharges discontinues, occasionnelles ou accidentelles, peuvent se produire en toutes circonstances de lieu et de temps, sans périodicité ni localisations prévisibles.

- Sources diffuses

Les rivières, le ruissellement des eaux, les retombées atmosphériques participent activement à la pollution de l'environnement.

### 1.2 Effets

Si les effets indésirables directs, continus ou sporadiques sont bien connus et ne demandent pas de développement ni de commentaires particuliers, il faut, par contre, insister sur les effets indirects. Nombre de produits, substances ou de phénomènes physiques, dérivés de l'activité humaine, peuvent, même s'ils n'ont aucun effet direct apparent, modifier de façon décisive le milieu marin et y provoquer, par des phénomènes d'interférences, des effets parfaitement indésirables -voire désastreux- pour le milieu.

## 2. MOTIVATIONS ET BUTS DES TESTS

La multiplicité, au moins apparente, des tests (ou bioessais) tient aux faits suivants: les exigences vis-à-vis de la qualité des eaux, le niveau de protection de l'environnement souhaité, la multiplicité des organismes (espèces) et des systèmes écologiques (communautés, écosystèmes), la variété des types de décharges et des polluants rejetés, pour ne citer que quelques exemples.

*) Les parties contractantes de la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution (Barcelone) se sont engagées à promouvoir des mesures concernant la protection du milieu marin dans la zone de la mer Méditerranée contre tous les types et sources de pollution tels que:

- Pollution due aux opérations d'immersion effectuées par les navires et aéronefs,
- Pollution par les navires,
- Pollution résultant de l'exploration et de l'exploitation du plateau continental, du fond de la mer et de son sous-sol,
- Pollution d'origine tellurique.

Il en résulte une très grande diversité des réponses mesurées qui peuvent, tout aussi bien, prendre en compte des phénomènes léthaux que subléthaux et s'adresser à des écosystèmes (naturels, artificiels, reconstitués en laboratoire, etc...) qu'à des réactions enzymatiques intracellulaires.

Si la littérature abonde en descriptions d'une multitude de tests, c'est que les problèmes posés sont multiples et nécessitent des voies d'approche variées.

2.1 Test généraux

Ils sont utilisés pour obtenir des indications sur les concentrations, potentiellement dangereuses pour la vie marine, des substances testées. Ils sont utilisables pour déterminer un ordre croissant (ou décroissant) de toxicité de ces substances (par exemple pour guider le choix des détergents et dispersants utilisés lors des "marées noires").

On choisit un petit nombre d'espèces "standard" dont la large répartition géographique permettra de comparer les résultats dans diverses localités (ou laboratoires). Ce sont des tests en général léthaux (parfois subléthaux).

Bien "standardisés" et soigneusement réalisés, ils apporteront de nombreuses informations.

Au niveau strictement subléthal, ils permettent de déterminer, en général de manière qualitative plutôt que quantitative, des altérations à caractères histologiques et tératologiques ou biochimiques.

2.2 Tests légaux *

Identiques aux prédédents, mais définis et utilisés sur un plan légal (gouvernemental ou intergouvernemental).

2.3 Tests pour l'établissement de critères de qualité des eaux et de surveillance continue des effluents

Ils sont en général non standardisés et répondent à des situations locales, liées à la variété des rejets (ou à leur complexité) tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Ils ont essentiellement pour but de définir des niveaux de "sécurité" vis-à-vis des conséquences écologiques. Ils sont fréquemment réalisés "in situ".

2.4 Tests de protection des niveaux trophiques supérieurs

Les tests d'accumulation sont essentiellement utilisés pour juger de l'effet possible, sur les niveaux trophiques supérieurs, de substances accumulées dans les tissus d'organismes marins. Ces tests prennent alors en compte les transferts (et accumulations essentielles) au travers des chaînes alimentaires, ainsi que des incidences possibles sur la santé de l'homme, considéré comme consommateur ultime, situé au plus haut échelon de la chaîne alimentaire.

On peut, de même, dans le cadre des tests tendant à assurer la protection des hauts niveaux trophiques, prendre en compte les tests permettant de juger des conséquences écologiques des divers types de pollution.

Les tests décrits dans ce Manuel ne peuvent en aucune manière être considérés comme des tests conseillés à des fins légales. Cependant, le but final est de proposer, sur la base de l'expérience acquise en Méditerranée (pendant leur mise en application), l'utilisation des tests par les Etats riverains comme méthodes de référence pour les études sur la pollution en mer Méditerranée, dans l'accomplissement de leurs obligations envers la Convention de Barcelone.

2.5 Tests de biostimulation

Ils ont pour but d'identifier les problèmes liés à l'eutrophisation accélérée (distrophie). La stimulation de la croissance d'algues peut être appréciée par des tests, soit de laboratoire, soit sur le terrain.

2.6 Tests divers

La surveillance continue des effluents ou des aires de décharges ne rentre pas dans le cadre de ce Manuel.

Les tests organoleptiques, utilisés pour déterminer l'acceptabilité des produits de la mer dans l'alimentation humaine, et qui nécessitent la présence de "goûteurs" avertis, n'ont pas davantage à être pris en compte par ce Manuel.

## 3. TYPES DE PROCEDURES

3.1 Données générales

Le mot bioessai est utilisé dans ce Manuel suivant la définition reprise du document FAO, FIRI/T164, chapitre 4:

"Bioessai signifie un test dans lequel un tissu vivant, un organisme ou un groupe d'organismes est utilisé comme réactif pour la détermination du potentiel d'une quelconque substance physiologiquement active, d'activité inconnue."

Ce terme de bioessai aura un sens très large, prenant en compte pratiquement tout type de test avec des organismes.

On peut utiliser des tests qui donneront des réponses directes ou indirectes.

Les bioessais, au sens strict du terme, tels qu'ils sont envisagés dans ce Manuel, mesurent des réponses directes. Les tests à réponses indirectes, ne seront mentionnés que pour mémoire.

3.1.1 Tests à réponse directe

a) Tests de toxicité

Leur objectif est de déterminer la concentration qui est juste suffisante pour produire, après un temps donné d'exposition, une réponse donnée, indicatrice de toxicité (mort, immobilisation, atteinte au potentiel reproducteur, etc...).

Ces tests serviront aussi à déterminer la rapidité et le degré de réponse. Ces tests peuvent être statiques ou à flux continu.

Un bioessai statique est réalisé sans renouvellement continu des solutions testées, mais avec ou sans leur renouvellement périodique. Ce renouvellement est nécessaire avec certains toxiques qui évoluent beaucoup. De tels bioessais peuvent être considérés comme supérieurs aux tests avec flux continu quand il est nécessaire de faire "vieillir" le milieu expérimental pour la détection et la mesure de toxicités latentes. Ils sont, aussi, utiles dans l'évaluation de décharges sporadiques ou accidentelles avec de fortes concentrations initiales.

Un bioessai à flux constant est un bioessai dans lequel le flux continu est réalisé avec un renouvellement continu ou presque continu des dilutions testées, et où des concentrations constantes de produits toxiques actifs peuvent être facilement maintenues.

b) Tests de répulsion

Ils servent pour mesurer les réactions de répulsion ou d'évitement d'animaux à un polluant. Ils peuvent, tout aussi bien, mesurer des réactions d'attraction. Il s'agit en fait de déterminer des anomalies et des modifications du comportement ("behaviour") des animaux. Leurs qualités prédictionnelles sont parfois difficiles à établir et exigent de nombreuses précautions.

c) Tests de bioaccumulation et d'accumulation trophique

Ces tests sont nécessaires pour mesurer les effets de polluants s'accumulant dans le milieu marin, en général, et plus particulièrement dans les tissus végétaux et animaux.

L'accumulation, même si elle ne se montre pas toxique au début de la chaîne trophique, peut se révéler l'être, y compris jusqu'à la mort, au fur et à mesure que l'on remonte la chaîne des prédateurs (ou consommateurs).

Les concentrations dans l'eau doivent être corrélées non seulement avec les réponses des organismes, mais aussi avec des mesures de polluants accumulés dans les tissus. Il faut également tenir compte, dans le cadre des relations proies/prédateurs, du risque pour ces derniers d'ingérer des proies préalablement contaminées.

d) Tests de biostimulation

Ces tests, conduits avec des algues, détectent et mesurent la possibilité qu'auraient des rejets domestiques ou des polluants chimiques de favoriser (ou de réduire) la multiplication et la croissance d'algues. L'eutrophisation et les floraisons algales sont prises en compte ainsi que leurs effets (bénéfiques ou néfastes) sur les eaux réceptrices.

e) Surveillance écologique

L'observation sur le terrain peut être considérée comme une bioévaluation ultime, afin d'être assuré que les tests de laboratoire, léthaux ou subléthaux, ont une signification effective sur le terrain. Les communautés naturelles intègrent, dans le temps, les effets des rejets (et de la pollution globale).

Les investigations prennent en compte l'analyse des communautés, selon les critères classiquement utilisés en l'occurence, et l'observation de l'évolution de ces communautés peut fournir des indications précieuses sur l'influence éventuelle de la pollution (ou des polluants) sur les communautés observées.

On peut également, soit créer de petits écosystèmes artificiels, soit manipuler sur des écosystèmes naturels de petites dimensions. Ces méthodes de bioévaluation sont cependant coûteuses en temps et complexes.

3.1.2 Tests à réponse indirecte

Ces tests ne sont pas pris en compte dans ce Manuel.

Les tests organoleptiques sont à effectuer avec des précautions particulières. Des "hommes testeurs" (goûteurs) sont utilisés comme "organismes de bioessais". Ces tests doivent être exécutés dans le cadre d'études alimentaires.

Les effets indirects peuvent être obtenus avec des tests de biostimulation: apparition de toxines dans les poissons après les "eaux rouges" ("red tides"), désoxygénation des floraisons algales.

Les études et contrôles sur le terrain permettent de mettre en évidence des actions indirectes liées à la modification du substrat, aux variations de l'oxygène dissous etc...

## 3.2 Procédures expérimentales (protocoles expérimentaux)

### 3.2.1 Sélection des organismes

Le choix des organismes doit se faire en fonction du but poursuivi (et de la nature du test finalement choisi) en tenant compte d'un certain nombre de critères qui tiennent aux contraintes expérimentales et à la spécificité même des organismes.

Les conditions générales doivent prendre en compte:

- la facilité de se procurer les organismes,
- leur bonne résistance aux conditions de laboratoire (éventuellement leur grande faculté d'adaptation ou de résistance au stress),
- leur taille en rapport avec les possibilités expérimentales,
- leur biologie (qui doit être connue): longévité, cycle de développement, alimentation, comportement, etc...,
- leur répartition géographique dans l'aire considérée (Méditerranée).

Les conditions liées aux organismes eux-mêmes doivent prendre en considération:

- le groupe taxonomique de l'organisme (et sa représentativité éventuellement au sein du groupe),
- le niveau trophique,
- le niveau écologique (et notamment sa valeur en tant qu'indicateur de telle ou telle condition de milieu, d'importance, de nature ou d'absence de pollution, etc...),
- le stade de développement auquel cet organisme est susceptible d'être utilisé,
- la valeur économique (poissons, crustacés, mollusques).

Les espèces obligatoires ou recommandées par la Consultation d'experts FAO (CGPM)/PNUE tenue à Rome (23 juin-4 juillet 1975) sont judicieusement choisies en général, encore que les espèces "obligatoires" soient certainement les plus contestables. (Difficultés ou impossibilités locales à récolter des Mytilus galloprovincialis ou des Parapenaeus longirostris, par exemple.)

Les espèces sélectionnées pour les bioessais décrits dans ce Manuel sont les suivantes:

Capitella capitata (Fabricius), 1780-(Fauvel, 1927)

Mytilus galloprovincialis (Lamarck), 1819-(Fischer, W. (ed), 1973)

Tisbe bulbisetosa (Volkmann Rocco, 1972)

Idotea balthica basteri Audouin, 1827-(Tinturier-Hamelin, 1963)

Palaemon elegans Rathke, 1837-(Zariquiey Alvarez, 1968)

Mugil auratus Risso, 1810-(Fischer, W. (ed), 1973)

### 3.2.2 Récolte et maintien en vie des espèces choisies

La possibilité de cultiver en laboratoire de nombreuses espèces doit être mentionnée. Il est, bien entendu, nécessaire d'obtenir le cycle complet du développement de l'espèce.

Les cultures d'algues sont relativement courantes et de nombreux laboratoires disposent, en élevage permanent, de nombreuses souches d'espèces diverses.

La culture d'invertébrés (et a fortiori de poissons) apparaît plus compliquée, et, surtout, moins fréquente. On peut, toutefois, obtenir au laboratoire diverses espèces de polychètes appartenant aux genres Capitella, Scolelepis, Ctenodrilus, Nereis ou des crustacés (Jaera, Idotea, Tisbe), etc... Partant d'un très petit nombre d'individus et de préférence d'un seul couple (voire d'un seul individu: Ctenodrilus serratus), on obtient de véritables clones, forts utiles et dans lesquels on pourra aisément puiser.

La récolte dans le milieu naturel demeure, toutefois, la règle. Elle s'effectue avec des engins de récolte classiques tant en plancton, qu'en benthos, ou en pêche normale, le problème essentiel étant de réaliser ces récoltes avec le plus grand soin afin d'obtenir des individus aussi peu abîmés que possible. Les soins pris lors de la récolte doivent se poursuivre lors du transport au laboratoire. Il faut éviter tout contact avec le milieu aérien et donner aux animaux toute l'eau (et l'oxygénation) souhaitable en renouvelant l'eau aussi souvent que possible. Il faut éviter un échauffement sensible de l'eau pendant le transport.

Au laboratoire, les animaux doivent être transférés dans des bacs ou récipients de taille convenable dans lesquels ils ne devront pas être trop nombreux; les changements de qualité de l'eau et, notamment, la température doivent être progressifs en vue d'atteindre les conditions ambiantes qui seront celles de la stabulation, laquelle durera au moins sept jours. La nature de cette maintenance variera selon les espèces ainsi que les soins (alimentation, oxygénation, etc...) à donner aux animaux. Dès l'arrivée au laboratoire, on éliminera tous les individus présentant un signe quelconque de mauvaise condition, de blessure ou de parasitisme. Il est bon de vérifier, à partir d'échantillons, que les animaux ne sont point eux-mêmes contaminés préalablement à leur récolte, notamment par les corps auxquels ils seront soumis au cours des expérimentations. Une prolongation de la stabulation peut être une parade à cet état de choses.

A la fin de la période de stabulation, il faut transférer les animaux dans les bacs de stockage normaux, en les acclimatant progressivement aux conditions expérimentales futures, la durée variant en fonction du type d'organismes et de l'amplitude des changements dans la qualité de l'eau. Les bacs de stockage devront être nettoyés fréquemment (tous les jours ou tous les deux jours). Il conviendra d'utiliser de préférence un flux continu d'eau ou d'en changer fréquemment.

Il faut des animaux sains, conservés dans une ambiance saine, contrôlée, stable.

### 3.2.3 Laboratoire d'expérience

La salle d'expérience doit être climatisée. Compte tenu des grandes quantités d'eau utilisées, une climatisation "type bureau" s'avère en général insuffisante. Pour éviter au maximum les variations thermiques, l'utilisation d'un local en sous-sol est souvent intéressante. La stabilité de la température est absolument nécessaire. Il peut être suggéré de la maintenir toute l'année à un niveau légèrement inférieur à la moyenne de température des eaux dans le lieu de récolte. On peut aussi être amené à conduire des bioessais à des températures bien particulières et on pourra amener la température de la salle à ce niveau. Il est essentiel que les variations de température dans la salle d'expérience soient réduites au maximum, et ne soient réalisées qu'à des périodes très éloignées. La température doit être contrôlée fréquemment (si possible avec des enregistreurs) en divers points de la salle et dans les divers milieux expérimentaux (ou de stockage).

Si l'on veut réaliser des expériences à des températures différentes de celles de la salle ou, a fortiori, des expériences à des températures différentes, il faut, soit refroidir, soit réchauffer, certains milieux. L'utilisation d'un système de bain-marie apparaît souhaitable pour arriver à un bain parfaitement thermostaté; il peut être nécessaire d'utiliser simultanément un cryostat et un thermostat. L'utilisation des

systèmes à flux continu peut nécessiter le réchauffement ou le refroidissement de l'eau, à la sortie du réservoir, et avant le mélange avec le polluant; ceci, notamment, lorsque le flux d'eau utilisé est très important.

L'arrivée d'eau de mer peut se faire par l'intermédiaire de tuyaux en PVC dont on se sera, au préalable, assuré de l'innocuité. Cette règle est valable pour l'ensemble des matériaux utilisés dans les expériences.

L'aération des salles d'expériences, en particulier celles de petite taille, doit être satisfaisante. L'éclairage de la salle doit se faire, de préférence, avec des lampes "néon". Il est nécessaire de prévoir un dispositif permettant de simuler le type et les périodes de "lumière du jour" et d'obscurité selon le rythme saisonnier annuel (ou tout autre rythme).

Les différents systèmes de climatisation, aération et éclairage doivent être autant que possible automatisés et leur éventuel dérèglement doit être signalé par des systèmes d'alarme appropriés.

Les conditions de milieu (température, éclairage notamment) doivent être rigoureusement contrôlées.

3.2.4 Milieu expérimental

En principe, les milieux expérimentaux doivent répondre à un certain nombre de qualités concernant la température, la concentration en oxygène dissous, la salinité, le pH, etc..., correspondant à celles du milieu naturel. Ils doivent donc évoluer comme lui. Il faut se réserver toute possibilité de faire évoluer le milieu expérimental ou tout au moins être en mesure de créer des milieux expérimentaux correspondant aux différents paramètres variables de la qualité de l'eau du milieu naturel.

Le premier problème du milieu expérimental concerne la qualité de l'eau de mer. On peut utiliser soit de l'eau de mer naturelle, soit de l'eau de mer artificielle.

L'eau de mer artificielle apparaît, en dépit de son coût, séduisante par le fait qu'on peut aisément obtenir une eau à la salinité choisie et, en principe, pure. Elle présente toutefois quelques inconvénients, tels que la difficulté à dissoudre certains sels ou la présence d'agents chélateurs imprévus.

L'eau de mer naturelle est souvent beaucoup plus facile à obtenir, à faible coût et en quantité quasiment illimitée. Malheureusement, de nombreux laboratoires sont approvisionnés en eau de mer par des conduites puisant cette eau dans des zones contaminées et même franchement polluées, et notamment par les polluants que l'on étudie, ou qui peuvent avoir des effets synergiques ou antagonistes.

Cette eau, telle quelle, est absolument impropre aux bioessais. Dans de telles circonstances, il est indispensable d'aller chercher l'eau au large, loin de toute source de pollution, ce qui entraîne l'accroissement des coûts et des problèmes de stockage.

L'utilisation de l'eau de mer artificielle permet aisément d'obtenir la salinité requise. Il faut toutefois contrôler cette salinité après la dissolution des sels, et périodiquement lorsque cette eau est stockée ou utilisée plusieurs jours après sa fabrication.

La salinité de l'eau de mer naturelle doit être aussi contrôlée et notée systématiquement (y compris en cours d'expérience dans le cas où il y aurait le moindre risque d'évaporation). Pour abaisser la salinité de l'eau de mer, il suffit de la diluer à l'aide d'eau distillée ou totalement déminéralisée. Pour accroître la salinité, on peut utiliser le chauffage modéré, avec évaporation lente, ou bien l'évaporation par ébullition forte et prolongée, donnant un liquide de très haute salinité

auquel il suffira d'ajouter de l'eau distillée pour abaisser la salinité jusqu'au niveau souhaité. La concentration de l'eau de mer se fait par dépôts successifs des sels et, bien entendu, la qualité des sels dissous ne sera pas identique à celle rencontrée à la salinité normale. Dans ce cas, si la salinité est mesurée avec un appareil à résistivité, il est possible de trouver des différences notables avec les valeurs obtenues par la méthode classique de détermination chimique. On peut partiellement y remédier en mélangeant une eau de mer très fortement concentrée (par exemple 100 °/oo) avec de l'eau de mer à salinité normale. La salinité mesurée par méthode chimique est elle aussi extrapolée (par calcul) à partir du dosage de la chlorinité.

D'autres critères de qualité du milieu peuvent être modifiés, volontairement ou non, et doivent de ce fait être contrôlés. C'est le cas du pH et de l'oxygène dissous.

L'insufflation d'air est généralement utilisée pour maintenir la concentration d'oxygène dissous au niveau normal. Il existe des appareils permettant un contrôle automatique de la concentration d'oxygène.

Il faut une eau de mer rigoureusement pure. On doit contrôler régulièrement la salinité, la température, la concentration en oxygène dissous, le pH du milieu expérimental.

### 3.2.5 Matériel expérimental

#### a) Tests statiques

Les récipients utilisés sont extrêmement variables dans leurs formes et leurs dimensions. Ils peuvent, de même, être en verre, en plastique, en fibres de verre, voire en bois plastifié.

En fait, le premier critère à prendre en compte tient à l'adéquation: dimension du récipient/dimension des organismes. Le second critère tient à la matière dont ils sont faits. Les récipients ne doivent pas être toxiques par eux-mêmes et, dans certains cas, ils doivent subir une préparation préalable (par exemple, on doit les mettre à tremper plusieurs semaines dans de l'eau de mer fréquemment renouvelée afin de leur faire "dégorger" des substances solubles pouvant être toxiques: c'est le cas des cuves en fibrociment). Il faut, de même, veiller à ce que les produits toxiques à tester ne puissent s'adsorber sur les parois. S'il n'est point possible d'éviter ou de contrôler cette adsorption, il faudra en tenir compte, notamment en multipliant le renouvellement des solutions. Les récipients en verre ou "plexiglass" apparaissent les plus fiables de ce point de vue, mais malheureusement coûtent cher et sont fragiles. Aussi utilise-t-on de plus en plus des récipients en polystyrène. Pour les tests avec les algues (et notamment les tests de biostimulation), on utilise des tubes, des fioles d'Erlenmeyer, des flacons de culture, des boîtes de Pétri.

Les tests avec les animaux se font avec des boîtes de Pétri de tailles variables, particulièrement faciles à manipuler, permettant l'examen à la loupe binoculaire, dans des béchers ou dans des bacs ou cuvettes. Ces récipients doivent être soigneusement couverts (voire bouchés) afin de prévenir au maximum l'évaporation des solutions. Il est préférable de prévoir un individu par récipient, compte tenu de la tendance à l'agglomération, à l'enchevêtrement ou au cannibalisme de très nombreuses espèces. De surcroît, les individus morts ou moribonds altèrent très rapidement le milieu, contaminant artificiellement les autres individus. La taille des récipients conditionnera, en tout état de cause, le nombre d'individus mis dans chacun d'eux.

Il est souvent nécessaire de prévoir des supports ou d'autres systèmes permettant la survie ou, plus simplement, l'isolement des individus. Les animaux à distribuer pour les divers tests doivent être choisis selon des critères rigoureusement statistiques, si on veut avoir des résultats fiables: les sous-échantillons soumis à plusieurs tests doivent être les plus homogènes possible entre eux, en ce qui concerne la taille, le sexe, l'âge (ou le stade physiologique) des individus qui les composent.

- Renouvellement des milieux

Le renouvellement des milieux est, a priori, une nécessité au cours des essais statiques pour pallier les méfaits de l'évolution de ce milieu (variation de salinité, d'oxygène dissous, de pH, évolution du polluant, excrétions du métabolisme des organismes etc...).

Dans les tests dépassant les classiques 96 h, ce renouvellement est indispensable, à moins que le volume de la solution contenant les animaux ne soit très grand par rapport au nombre et à la taille de ces animaux. Il doit se faire précautionneusement et présente de grandes difficultés pour les animaux de petite taille (zooplancton par exemple ou les stades larvaires), la filtration sur toile à mailles fines n'étant pas aisément réalisable avec toute la sécurité nécessaire.

Les organismes peuvent être transférés d'un récipient dans un autre par pipetage ou capture à l'aide de pinces, petits filets, ou tout autre appareillage qui ne risquera, ni de provoquer la perte d'individus, ni de les blesser.

Si on conserve tout au long du bioessai le même récipient, on pourra être amené à ne remplacer qu'une partie (du 1/3 au 3/4) du volume du milieu.

Ce renouvellement doit se faire au moins deux fois par semaine, voire tous les deux jours et à la limite chaque jour. On aura soin de débarrasser (en général par pipetage) le récipient de tous les débris, restes de nourriture, excrétions, etc... Cette opération est le plus souvent valable même lors des essais à court terme ne nécessitant pas de renouvellement du milieu.

- Alimentation

Dans les bioessais à long terme (ou à terme intermédiaire), et pour certains bioessais sur des larves, même s'ils ne se prolongent que quelques jours, on est amené à fournir de la nourriture aux organismes.

Cette nourriture varie, bien entendu, avec ces derniers. Il est bon de savoir qu'on a tendance à fournir un excès de nourriture et que celle-ci, non absorbée ou digérée, ne peut qu'altérer le milieu.

En général, on fournira des nutrients aux algues. Le zooplancton et les larves sont souvent nourris avec des algues phytoplanctoniques dont la culture en masse au laboratoire est une technique, actuellement, bien maîtrisée.

b) Tests à flux continu

Les tests à flux continu apparaissent hautement souhaitables pour les polluants chimiques qui ont une grande demande en oxygène ou sont instables ou volatils. Il en est de même avec les espèces de grande taille ou de métabolisme élevé.

Les tests à flux continu requièrent des pompes doseuses et divers autres appareillages pour l'admission précise de polluants ou de matières à tester dans l'eau de dilution avant l'arrivée dans les récipients où sont effectués les tests. Le mélange des polluants dans l'eau de mer peut se faire avec difficulté, surtout lorsqu'il est automatisé et effectué en continu. De surcroît, il est parfois nécessaire de prévoir divers systèmes d'agitation pour maintenir le mélange homogène (mais ceci est aussi valable pour les tests statiques).

Le dispositif de base d'un système de bioessais à flux continu comprend un grand récipient contenant de l'eau de mer, et un plus petit contenant le polluant (ou une solution très concentrée du polluant). Un dispositif quelconque (du plus simple au plus sophistiqué) permet d'obtenir un mélange dans des proportions définies préalablement afin d'avoir une solution pour les tests de concentrations voulues, laquelle sera conduite vers les récipients où se déroulent les bioessais eux-mêmes.

**Les matériaux et ustensiles utilisés doivent être aussi inertes que possible. Ils ne doivent jamais être constitués du produit que l'on veut tester.**

3.2.6 Introduction des polluants

L'introduction des polluants nécessite souvent une préparation préalable. Dans les tests à flux continu, un certain nombre d'opérations sont effectuées automatiquement, mais il peut se faire néanmoins que certaines manipulations soient nécessaires avant l'introduction du polluant dans le réservoir spécial.

Pour les tests statiques, il faut préparer les solutions de polluants à l'avance, de sorte qu'elles puissent être ajoutées à l'eau de mer dans les quantités nécessaires pour obtenir les différentes concentrations souhaitées. Il faut tenir compte de l'instabilité possible des polluants. Toutes les solutions destinées à une même série d'expériences doivent être réalisées à partir d'un stock commun.

Certains polluants, tels les pétroles et les huiles, sont difficiles à répartir uniformément dans la solution-test. Ils nécessitent une agitation continue. Il en va de même pour les essais avec des particules solides insolubles, d'aussi petite taille soient-elles.

Les modifications diverses pouvant intervenir au sein de la solution à tester et au sein du milieu expérimental pendant la durée du test gouvernent étroitement la manière dont les tests seront conduits et dont les polluants seront introduits, maintenus en mélange ou suspension homogène et renouvelés. Compte tenu des variations fréquentes de la concentration en polluants des effluents, on est souvent tenu de réaliser expérimentalement de telles variations, c'est-à-dire de faire varier, dans le temps, la concentration d'un polluant au cours d'une même expérience. Il est évident qu'un système de flux continu facilite ces variations et résoud plus correctement l'introduction irrégulière du polluant dans le milieu expérimental.

Il faut noter aussi qu'il peut être nécessaire d'utiliser des solvants (de préférence non toxiques ou tout au moins faiblement toxiques) pour disperser ou dissoudre le polluant. Il faut alors, soit tester la toxicité propre du solvant, soit préparer deux contrôles, l'un sans additif, l'autre avec la plus haute concentration utilisée de cet additif (solvant).

Lorsque la solution est très fortement toxique, on ne doit pas ajouter le polluant en quantité mesurée directement dans le récipient d'expérience. On peut le diluer dans une certaine fraction du volume d'eau de mer du récipient qui sera ajoutée par la suite. De même, lorsqu'il y a de très nombreux récipients, il peut être intéressant de les remplir avec seulement la moitié de l'eau requise, d'y mettre les animaux, puis de compléter le milieu en y ajoutant le même volume d'une solution dont la concentration est le double de celle que l'on veut finalement obtenir.

Le tableau ci-joint peut être utile pour déterminer les volumes de solutions-mères convenables (ou les dilutions) à ajouter.

Tableau I

Dilutions pour des concentrations variées des solutions-test

| Concentration désirée de la solution-test | | | Volume de solution-mère à ajouter à l'eau de mer pour 1 litre de solution-test ml | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % | mg/l | µg/l | 100 g/l | 10 g/l | 1 g/l | 0,1 g/l | 0,001 g/l |
| 1,0 | 10.000 | | 100 | | | | |
| 0,56 | 5.600 | | 56 | | | | |
| 0,32 | 3.200 | | 32 | | | | |
| 0,18 | 1.800 | | 18 | | | | |
| 0,10 | 1.000 | | 10 | 100 | | | |
| 0,056 | 560 | | 5,6 | 56 | | | |
| 0,032 | 320 | | 3,2 | 32 | | | |
| 0,018 | 180 | | 1,8 | 18 | | | |
| 0,010 | 100 | | 1,0 | 10 | 100 | | |
| 0,0056 | 56 | | | 5,6 | 56 | | |
| 0,0032 | 32 | | | 3,2 | 32 | | |
| 0,0018 | 18 | | | 1,8 | 18 | | |
| 0,0010 | 10 | | | 1,0 | 10 | 100 | |
| 0,00056 | 5,6 | | | | 5,6 | 56 | |
| 0,00032 | 3,2 | | | | 3,2 | 32 | |
| 0,00018 | 1,8 | | | | 1,8 | 18 | |
| 0,00010 | 1,0 | 1.000 | | | 1,0 | 10 | 100 |
| 0,000056 | 0,56 | 560 | | | | 5,6 | 56 |
| 0,000032 | 0,32 | 320 | | | | 3,2 | 32 |
| 0,000018 | 0,18 | 180 | | | | 1,8 | 18 |
| 0,000010 | 0,10 | 100 | | | | 1,0 | 10 |
| 0,0000056 | 0,056 | 56 | | | | | 5,6 |
| 0,0000032 | 0,032 | 32 | | | | | 3,2 |
| 0,0000018 | 0,018 | 18 | | | | | 1,8 |
| 0,0000010 | 0,010 | 10 | | | | | 1,0 |

Source: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Association, © 1976, reproduit avec l'aimable autorisation de l'éditeur.

# 4. LES TESTS

## 4.1 Test à court terme avec Capitella capitata

- Espèce: Capitella capitata

- Polluant: chlorure de cadmium

- Solution de départ: à 1 000 mg/l de cadmium dans de l'eau désionisée.

- Préparation de la solution de départ (solution-mère):
dissoudre 1,63 g de chlorure de cadmium dans 1 litre d'eau désionisée; vérifier, si possible, la concentration par analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique.

- Concentrations à utiliser:
1,0; 3,2; 5,6; 10,0 et 32,0 mg/l; bissection progressive des intervalles sur une échelle logarithmique.
Si on n'a aucune idée de la toxicité du polluant, préparer une expérience préliminaire (ou générale) avec de larges écarts de concentrations, par exemple: 1 000; 500; 100; 50; 25; 10; 5; 1; 0,5; 0,25; 0,10 mg/l (on peut supprimer certaines concentrations plus faibles, etc...); plus un lot témoin (contrôle). Cette expérience achevée, on choisira les concentrations pour le bioessai réel.

- Préparation des concentrations:
Les concentrations pour les bioessais seront faites dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre, à partir de la solution à 1 000 mg/l de cadmium. Les solutions de cadmium seront préparées comme suit:

| Concentration finale mg/l | ml de la solution-mère à 1 000 mg/l | |
|---|---|---|
| 32,0 | 32,0 | |
| 10,0 | 10,0 | |
| 5,6 | 5,6 | Ajuster à 1 litre avec de l'eau de mer |
| 3,2 | 3,2 | |
| 1,0 | 1,0 | |

Prévoir un "témoin" avec de l'eau de mer pure (sans chlorure de cadmium).

- Source d'eau de mer:
eau de mer artificielle ou naturelle. L'eau de mer naturelle doit provenir d'une zone non contaminée par la pollution et être filtrée sur membrane de 0,45 µ. Ajuster, éventuellement, la salinité.

Température:
doit être notée chaque jour, être constante, ne pas dépasser 20° C si possible.

Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

Nourriture: pas de nourriture.

- Récipients expérimentaux:
boîtes de Pétri en plastique (polystyrène), jetables, diamètre 100 mm; hauteur 20 mm. Autant que possible, toutes les boîtes de Pétri seront neuves et auront été rincées avec de l'eau désionisée ou de l'eau de mer filtrée (pas d'eau courante). On marquera sur chaque boîte la concentration correspondante.

- Protocole expérimental:

1) Placer les Capitella provenant des stocks en stabulation dans de grands cristallisoirs en verre, précedemment lavés à l'acide nitrique dilué et rincés. Autant que possible, laisser sortir les vers librement de leur tube afin de réduire les manipulations. Toucher le tube à une de ses extrémités peut hâter la sortie du ver.

2) Transférer le ver dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de mer. Plusieurs vers peuvent être réunis dans la même boîte de Pétri.

3) Examiner chaque ver à la loupe binoculaire. Ecarter tous les vers blessés ainsi que les femelles avec des oeufs dans la cavité coelomique.

4) Utiliser 20 vers par concentration. Un ver par boîte de Pétri donnera 20 boîtes par concentration. Une distribution au hasard ("random") des individus dans les boîtes de Pétri est souhaitable. Remplir les boîtes avec 50 ml de la solution correspondant à la concentration choisie (50 ml d'eau de mer pour les "témoins").

5) Durée de l'expérience: 96 heures, sans renouvellement du milieu expérimental.

6) Observations (sous loupe binoculaire) au bout de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. La mort de Capitella est définie comme l'absence de mouvements lorsque le ver est touché légèrement. Si le ver est fragmenté, l'exemplaire sera considéré comme mort si la partie antérieure est morte, sans prendre en considération l'état de la partie postérieure. Les données sont reportées sur des fiches convenables. Additionnellement, il est intéressant de noter la présence ou l'absence de tube et de pelletes fécales.

## 4.2 Test à long terme avec Capitella capitata (Reish et al., 1978)

**Espèce:** Capitella capitata

**Polluant:** chlorure de cadmium

**Solution de départ:** à 1 000 mg/l de cadmium dans de l'eau désionisée.

**Préparation de la solution de départ (solution-mère):**
dissoudre 1,63 g de chlorure de cadmium dans 1 litre d'eau désionisée, vérifier si possible, la concentration par analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique.

**Concentrations à utiliser:**
0,1; 0,32; 0,56; 1,0 et 3,2 mg/l; bissection progressive des intervalles sur une échelle logarithmique.

**Préparation des concentrations:**
Les concentrations pour les essais seront faites dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre à partir de la solution à 1 000 mg/l de cadmium. De nouveaux milieux seront préparés à chaque renouvellement tout au long des essais (c'est-à-dire 2 fois par semaine). Les solutions de cadmium seront préparées comme suit:

| Concentration finale mg/l | ml de la solution-mère à 1 000 mg/l | |
|---|---|---|
| 3,2 | 3,2 | |
| 1,0 | 1,0 | |
| 0,56 | 0,56 | Ajuster à 1 litre avec de l'eau de |
| 0,32 | 0,32 | |
| 0,10 | 0,10 | |

Prévoir un "témoin" avec de l'eau de mer pure (sans chlorure de cadmium).

**Source d'eau de mer:**
eau de mer artificielle ou naturelle. L'eau de mer naturelle doit provenir d'une zone non contaminée par la pollution et être filtrée sur membrane de 0,45 µ. Ajuster, éventuellement, la salinité.

- [illegible]
  doit être notée chaque jour, être constante, ne pas dépasser 20° C si possible.

- **Lumière:** cycle jour/nuit de 12 heures.

- **Nourriture:**
  Durant leur stabulation avant expérience (une semaine ± 1 jour) les Capitella seront nourries à la Tetramin (environ 0,20 g/jour par récipient de 4 à 5 l). Capitella capitata sera nourrie à l'Enteromorpha préalablement desséchée puis réhydratée pendant la durée des essais. Le protocole de cette nourriture sera expliqué plus loin.

- **Récipients expérimentaux:**
  boîtes de Pétri en plastique (polystyrène), jetables, diamètre 100 mm; hauteur 20 mm. Autant que possible, toutes les boîtes de Pétri seront neuves et auront été rincées avec de l'eau désionisée ou de l'eau de mer filtrée (pas d'eau courante).

- Protocole expérimental:

1) Placer les Capitella provenant des stocks en stabulation dans de grands cristallisoirs en verre, préalablement lavés à l'acide nitrique et rincés. Autant que possible, laisser sortir les vers librement de leur tube afin de réduire les manipulations. Toucher le tube à une de ses extrémités peut hâter la sortie du ver.

2) Transférer le ver dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de mer convenable. Plusieurs vers peuvent être réunis dans la même boîte de Pétri.

3) Examiner chaque ver à la loupe binoculaire. Ecarter tous les vers blessés ainsi que les femelles avec des oeufs dans la cavité coelomique.

4) Utiliser 42 vers par concentration:
3 vers par boîte de Pétri donneront 14 boîtes par concentration.
La distribution des vers dans les boîtes de Pétri devrait être faite au hasard ("random").
En cas de distribution au hasard, la contamination croisée des diverses concentrations du polluant dans les boîtes de Pétri se produira. Pour éviter cela, remplir toutes les boîtes de Pétri (y compris celles du lot "témoin") avec 25 ml d'eau de mer, distribuer les vers au hasard, puis ajouter 25 ml de solution de cadmium à une concentration double de la concentration finale requise (25 ml d'eau de mer pour les "témoins").

| Concentration finale mg/l | Ajouter 25 ml de solution de cadmium à mg/l |
|---|---|
| 3,2 | 6,4 |
| 1,0 | 2,0 |
| 0,56 | 1,12 |
| 0,32 | 0,64 |
| 0,1 | 0,2 |

Pour commencer l'expérience, il faudra lors de la préparation des concentrations doubler le volume de la solution-mère à 1 000 mg/l.

Ajouter alors la nourriture (Enteromorpha voir No. 6 page 18) dans chaque boîte de Pétri.

5) L'expérience durera 28 jours. Le milieu expérimental sera renouvelé deux fois par semaine. Les boîtes de Pétri ne seront pas changées. Préparer 1 000 ml de chaque concentration nécessaire (3,2; 1,0; 0,56; 0,32 et 1 mg/l). Vider précautionneusement les boîtes du liquide, en ayant grand soin de ne pas perdre de vers. Enlever l'excès de nourriture avec des pinces, mais ne pas déranger un ver qui serait dans un agglomérat de détritus.
Remplir la boîte de Pétri avec 50 ml de la solution convenable de cadmium et ajouter la nourriture (cf. n° 6). Les exemplaires seront examinés au bout de 24, 48, 72 et 96 h, puis 2 fois par semaine et le milieu expérimental renouvelé 2 fois par semaine (cf. n° 6). Toutes les observations seront faites sous la loupe binoculaire. La mort de Capitella est définie comme l'absence de mouvement lorsque le ver est touché légèrement. Si le ver est fragmenté, l'exemplaire sera considéré comme mort si la partie antérieure est morte, sans prendre en considération l'état de la partie postérieure. Les morts sont retirés des boîtes de Pétri lors de l'observation. Les données sont reportées sur des fiches convenables. Additionnellement, il est intéressant de noter la présence ou l'absence de tubes et de pelletes fécales de Capitella.

| Jour | | Durée | |
|---|---|---|---|
| Lundi | 1 | | - Mise en route de l'expérimentation |
| Mardi | 2 | 24 h | - Première observation |
| Mercredi | 3 | 48 h | - Deuxième observation |
| Jeudi | 4 | 72 h | - Troisième observation |
| Vendredi | 5 | 96 h | - Quatrième observation<br>Changer le milieu et la nourriture |
| Lundi | 8 | 7e jour | ) |
| Vendredi | 12 | 11e jour | ) |
| Lundi | 15 | 14e jour | ) |
| Vendredi | 19 | 18e jour | ) Chacun de ces jours effectuer l'observation et changer le milieu et la nourriture |
| Lundi | 22 | 21e jour | ) |
| Vendredi | 26 | 25e jour | ) |
| Lundi | 29 | 28e jour | ) |

6) Nourriture:

Directives pour obtenir assez de nourriture pour chaque changement des milieux expérimentaux, soit 5 concentrations, plus le témoin: (concentration nulle). Peser 1,42 g d'Enteromorpha desséchées. Les placer dans un broyeur avec 75 ml d'eau de mer. Broyer jusqu'à ce que les Enteromorpha soient réduites en petits morceaux de 2 à 3 mm et qu'il n'y ait plus de touffes. Sécher les Enteromorpha (sur gaze) sommairement. Les repeser humidifiées et diviser en 6 portions égales. Remplir 6 coupelles avec 15 ml de chaque concentration utilisée dans l'expérience. Ajouter les Enteromorpha dans chaque coupelle et mélanger. Déposer avec une pipette 1 ml de la nourriture appropriée dans chaque boîte de Pétri. Pour obtenir le plus approximativement possible la même quantité de nourriture dans chaque boîte, pipetter seulement 1 ml à chaque fois et agiter la coupelle à chaque fois. Utiliser une pipette en plastique de 10 ml, dont on aura coupé l'extrémité effilée.

Il est nécessaire de récolter les Enteromorpha dans une zone aussi peu contaminée que possible.

4.3 Test de mortalité à court terme avec la moule Mytilus galloprovincialis

Espèce: Mytilus galloprovincialis (taille des individus comprise entre 2,5 et 4 cm).

Polluant: chlorure de cadmium.

Solution de départ: à 1 000 mg/l de cadmium dans l'eau désionisée.

Préparation de la solution de départ (solution-mère):
dissoudre 16,3 g de chlorure de cadmium dans 10 litres d'eau de mer désionisée. Vérifier, si possible, la concentration par analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique.

Concentrations à utiliser:
1,0; 3,2; 5,6; 10,0 et 32,0 mg/l; bissection progressive des intervalles sur une échelle logarithmique plus un témoin. Si l'on ignore totalement la toxicité du produit, il est nécessaire de procéder au préalable à une expérience préliminaire (ou expérience générale) avec de larges écarts de concentrations: 1 000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0,25 et 0,10 mg/l plus un témoin.

Préparation des concentrations:
les concentrations pour les bioessais seront faites dans des bonbonnes en verre de 10 l à partir de la solution à 1 000 mg/l de cadmium. Les solutions de cadmium seront préparées comme suit:

| Concentration finale mg/l | ml de la solution-mère à 1 000 mg/l | |
|---|---|---|
| 32,0 | 320,0 | |
| 10,0 | 100,0 | |
| 5,6 | 56,0 | Ajuster à 10 litres avec de l'eau de mer |
| 3,2 | 32,0 | |
| 1,0 | 10,0 | |

Prévoir un "témoin" avec de l'eau de mer pure (sans chlorure de cadmium).

Source d'eau de mer:
eau de mer artificielle ou naturelle. L'eau de mer naturelle doit provenir d'une zone non contaminée par la pollution et être filtrée sur membranes de 0,45 µ. Ajuster, éventuellement, la salinité.

Température:
doit être notée chaque jour, être constante, ne pas dépasser 20° C si possible.

Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

Nourriture: pas de nourriture.

Récipients:
récipients en verre de préférence (ou en polyéthylène) d'une contenance de 3 l. Les récipients seront rincés à l'acide nitrique dilué, puis à l'eau désionisée ou à l'eau de mer filtrée. Prévoir un bouchon ou un couvercle adapté à la taille du récipient. On marquera sur chaque récipient la concentration correspondante.

- Protocole expérimental:

1) Placer les moules provenant des stocks en stabulation dans de grands cristallisoirs en verre, lavés à l'acide nitrique dilué et rincés. Brosser soigneusement les individus. Avoir soin de ménager le byssus.

2) Transférer les moules dans un grand cristallisoir contenant de l'eau de mer convenable. De nombreuses moules peuvent être réunies dans le même cristallisoir.

3) Vérifier que les moules soient bien fermées et ne s'ouvrent pas avec l'aide de la main. Pour les moules ouvertes, piquer délicatement et très brièvement avec un tube de verre effilé le bord du manteau; ne conserver que les individus qui se ferment immédiatement.

4) Utiliser 20 moules par concentration: 5 moules par récipient d'expérimentation donneront 4 récipients par concentration. La distribution des moules dans les récipients devrait être faite au hasard ("random"). Remplir les récipients avec 1 l de la solution à la concentration convenable (1 l d'eau de mer filtrée pour le "témoin"). Procéder à une arrivée d'air, faible, par bulleur.

5) Durée de l'expérience: 96 h (peut être portée à 144 h).
Pas de renouvellement du milieu expérimental si la durée de l'expérience n'excède pas les 96 h.

6) Observations au bout de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h (éventuellement 120 et 144 h).
La mort de Mytilus est définie comme l'absence de réaction lorsqu'on touche le bord du manteau des moules ouvertes avec un tube de verre effilé. La première piqûre sera légère et une seconde, accentuée, suivra si l'animal ne réagit pas. Tout individu considéré comme "mort" sera immédiatement retiré. La surveillance toutes les 12 h serait convenable. On considèrera comme morts au bout des 24, 48, 72 ou 96 h, les animaux morts dans l'intervalle. Les données sont reportées sur des fiches convenables.

4.4 Test de mortalité à court terme avec Tisbe bulbisetosa

- Espèce: Tisbe bulbisetosa, copépode harpacticoïde, environ 1 mm de long.

- Polluant: pétrole du Koweit.

- Préparation de la solution de départ:
on ajoute 1 ml de pétrole du Koweit et 0,2 ml de Corexit 7664* à 1 000 ml d'eau de mer filtrée de salinité 35 ± 1 °/oo et on agite pendant 5 h avec un agitateur magnétique à la température ambiante (environ 20° C). La rapidité de l'agitateur est calculée de manière à ce que le vortex ne soit pas supérieur à 25 % de la distance entre la surface du liquide et le fond du récipient. Puis, la suspension sera versée dans une ampoule à décantation avec bouchon de verre et laissée se reposer pendant 5 à 10 jours, afin qu'une partie du pétrole se stratifie en surface (Dalla Venezia et Fossato, 1977).

- Concentrations à utiliser:
à partir de la concentration réelle de la solution-mère, déterminée par analyse, on fabriquera les concentrations expérimentales (par exemple 5 mg/l).

- Préparation des concentrations:
les concentrations recherchées se préparent par dilution de la solution-mère avec de l'eau de mer. Par exemple, s'il résulte de l'analyse que la concentration de la solution-mère est de 42 mg/l d'hydrocarbures et si l'on veut obtenir une concentration de 5 mg/l, les volumes de suspension et d'eau de mer à mélanger pourront être calculés de la manière suivante:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Concentration solution-mère | 42 | | 5 | Volumes solution-mère |
| | | 5 mg/l | | |
| Concentration eau de mer | 0 | | 37 | Volumes d'eau de mer |

De surcroît, il faudra utiliser 2 témoins:
- une solution à 0,2 mg/l de Corexit 7664 dans de l'eau de mer
- de l'eau de mer.

- Source d'eau de mer:
eau de mer naturelle, prélevée en mer ouverte, loin de sources de pollution, conservée dans des récipients munis de filtre de charbon et de laine de verre, à flux continu avec rampe à rayons UV. Avant l'utilisation, l'eau sera filtrée à travers un entonnoir poreux pourvu d'un filtre de papier.

- Température: les animaux seront conservés dans des salles thermostatées à 18 ± 1°C.

- Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

- Nourriture:
tous les 2 jours, 0,5 ml de suspension de Dunaliella et petits fragments de froment bouilli, dans chaque capsule de 20 ml.

- Récipients: capsules en verre de 20 ml et de 100 ml, couvertes avec des disques de verre de dimensions adéquates.

* Corexit 7664, tensioactif à faible toxicité, ajouté ici pour faciliter la mise en suspension du pétrole dans l'eau de mer et la rendre plus stable dans le temps.

- Protocole expérimental:

1) Des exemplaires du genre Tisbe peuvent être recueillis avec un filet parmi les algues des petits fonds et déposés dans des petits récipients avec de l'eau de mer: après quelques heures, les Tisbe montent à la surface et peuvent être facilement récoltés avec une pipette de verre et transférés dans un autre récipient en verre , puis séparés espèce par espèce. Les récipients, d'une contenance de 3 l, contiennent de l'eau de mer et sont maintenus en chambre thermostatée. Il est important de mettre un thalle d'Ulva fraîche dans chaque récipient afin de garantir l'oxygénation de l'eau. La nourriture peut être administrée une fois par semaine en quantité adéquate. Du fait que le Tisbe a un cycle biologique bref, de 15 à 20 jours suivant les espèces, les exemplaires récoltés donneront rapidement des populations monospécifiques, qui deviendront toujours plus denses et fourniront autant d'exemplaires nécessaires déjà acclimatés, pour les expériences.

2) On isole 30-40 femelles ovigères prélevées dans la population-stock dans autant de capsules de 20 ml contenant de l'eau de mer, un fragment d'Ulva, un petit peu de froment et, éventuellement, 0,5 ml de suspension de Dunaliella.

3) On observe quotidiennement: les femelles qui ont déposé des nauplii sont enlevées de la capsule et sur le couvercle de celle-ci on écrit la date de naissance des nauplii.

4) Les nauplii sont contrôlés au moins tous les 2 jours jusqu'au 8-10e jour. Ils sont alors prêts pour être accouplés.

5) Pour l'accouplement, on procède comme suit, à partir d'individus de même âge contenus dans 30 capsules: on divise les capsules en 2 groupes de 15, on prélève les femelles des capsules du 1er groupe et on les unit aux mâles du 2e groupe, et vice versa. Les exemplaires à accoupler sont mis dans des capsules de 100 ml, si possible, à raison de 30 exemplaires par capsule.

6) Les femelles ovigères provenant de l'accouplement représentent les exemplaires qui seront utilisés dans les expériences (cette procédure est nécessaire pour obtenir des femelles qui soient toutes au même stade physiologique). Les mâles qui ont pris part à l'accouplement ont le même degré de maturité et peuvent être utilisés dans les expériences.

7) A ce moment, on prépare 10 capsules de 20 ml pour chaque concentration que l'on veut tester et pour chaque témoin (deux). Les capsules de chaque groupe sont numérotées de 1 à 10 avec des couleurs différentes. Dans chaque capsule, on dépose un fragment d'Ulva et un de froment. Pour s'assurer que la distribution des Tisbe dans les divers traitements sera faite au hasard, il convient de mettre en file toutes les capsules qui portent le même numéro et contiennent des solutions différentes, et de mettre 1 Tisbe par capsule en procédant par ordre dans toutes les capsules de la file. On répète l'opération jusqu'à ce qu'il y ait 5 exemplaires de Tisbe dans chaque capsule.

8) Durée de l'expérience: une semaine (ou plus selon la résistance des animaux); observations au bout de 24, 48, 72, 96 h etc...

9) Chaque jour, on contrôle toutes les capsules, on compte et on retire les exemplaires morts. Si on utilise 50 exemplaires pour chaque traitement comme indiqué ci-dessus, le calcul de la mortalité cumulée exprimée en pourcentage peut être effectué rapidement chaque jour.

4.5 Test à long terme avec Tisbe bulbisetosa

Espèce: Tisbe bulbisetosa, crustacé, copépode harpacticoïde, environ 1 mm de long.

Polluant: pétrole du Koweit.

Préparation de la solution de départ:
on ajoute 1 ml de pétrole du Koweit et 0,2 ml de Corexit 7664* à 1 000 ml d'eau de mer filtrée de salinité 35 ± 1 °/oo et on agite pendant 5 h avec un agitateur magnétique à la température ambiante (environ 20°C). La rapidité de l'agitateur est calculée de manière à ce que le vortex ne soit pas supérieur à 25 % de la distance entre la surface du liquide et le fond du récipient. Puis, la suspension sera versée dans une ampoule à décantation avec bouchon de verre et laissée se reposer pendant 5 à 10 jours, afin qu'une partie du pétrole se stratifie en surface (Dalla Venezia et Fossato, 1977).

Concentrations à utiliser:
concentrations subléthales d'hydrocarbures, inférieures à 5 mg/l et 0,02 ml de Corexit 7664*.

Préparation des concentrations:
les concentrations recherchées se préparent par dilution de la solution-mère avec de l'eau de mer. Par exemple, s'il résulte de l'analyse que la concentration de la solution-mère est de 42 mg/l d'hydrocarbures et si l'on veut obtenir une concentration de 5 mg/l, les volumes de suspension et d'eau de mer à mélanger pourront être calculés de la manière suivante:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Concentration solution-mère | 42 | 5 mg/l | 5 | Volumes solution-mère |
| Concentration eau de mer | 0 | | 37 | Volumes d'eau de mer |

De surcroît, il faudra utiliser 2 témoins:
- une solution à 0,2 mg/l de Corexit 7664 dans de l'eau de mer
- de l'eau de mer.

- Source d'eau de mer:
eau de mer naturelle, prélevée en mer ouverte, loin de sources de pollution, conservée dans des récipients munis de filtre de charbon et de laine de verre, à flux continu avec rampe à rayons UV. Avant l'utilisation, l'eau doit être filtrée à travers un entonnoir poreux pourvu d'un filtre de papier.

- Température: les animaux doivent être conservés dans des salles thermostatées à 18°C ± 1°C.

- Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

- Nourriture: un fragment d'Ulva et, tous les 2 jours, quelques petits morceaux de froment bouilli et des Dunaliella en fonction du volume de la capsule.

- Récipients expérimentaux: capsule de 100 et de 200 ml.

*Corexit 7664, tensioactif à faible toxicité, ajouté ici pour faciliter la mise en suspension du pétrole dans l'eau de mer et la rendre plus stable dans le temps.

- Protocole expérimental:

1) On prélève dans la population-stock un certain nombre de femelles ovigères et on les distribue au hasard dans des capsules de 100 ml contenant les diverses concentrations d'hydrocarbures, la solution de Corexit et d'eau de mer à la salinité de 35 ± 1 °/oo. Dans chaque capsule, on met un fragment d'Ulva.

2) Chaque 10-12 jours, les animaux seront transférés avec la pipette de verre dans d'autres capsules contenant de nouvelles suspensions, préparées depuis au moins 5 jours. En tenant compte de la durée du cycle biologique du Tisbe, après environ un mois de traitement on dispose d'animaux appartenant à une population qui, pendant 3 générations, a subi l'effet du polluant; après 45-50 jours on a quatre générations, et ainsi de suite. On détermine la génération que l'on souhaite soumettre à l'examen, soit aux environs de 30 jours, 45 jours au plus. On isole les femelles en accouplement, qui après quelques jours donneront leur premier sac ovigère, et on les met dans une autre capsule contenant la même concentration.

3) Quand le sac est mûr, on divisera au hasard les femelles ovigères de chaque concentration en deux groupes. Celles du premier seront sacrifiées afin de compter les oeufs contenus dans le sac; celles du second seront isolées, séparément, dans des capsules de 20 ml et on les laissera pondre afin de pouvoir compter les nauplii. Il convient de laisser les animaux sans nourriture pour éviter que les petits nauplii ne se confondent avec les restes.

4) Observations à réaliser:
   a) 1er groupe: on dépose la femelle sur une lame porte-objet dans une goutte de glycérine. Sous une loupe binoculaire, on rompt le sac avec 2 aiguilles de platine montées sur tube de verre et on compte les oeufs.
   b) 2ème groupe: dès que la femelle a déposé ses oeufs, on peut la retirer de la capsule afin de rendre plus aisé le comptage des nauplii, qui seront comptés un à un en les aspirant avec une pipette.

5) Les résultats donneront:
   a) le nombre moyen d'oeufs produits dans le 1er sac des femelles d'une population demeurée n générations dans un polluant donné.
   b) le nombre médian de nauplii produits dans le 1er sac des femelles de la même génération.
   c) le pourcentage d'éclosion, rapport du nombre de nauplii au nombre d'oeufs dans les mêmes conditions expérimentales.

## 4.6 Test de mortalité à court terme avec l'isopode Idotea balthica basteri

- Espèce: Idotea balthica basteri

- Polluant: chlorure de cadmium

- Solution de départ: à 1 000 mg/l de cadmium dans de l'eau désionisée.

- Préparation de la solution de départ (solution-mère):
dissoudre 16,3 g de chlorure de cadmium dans 10 litres d'eau désionisée; vérifier, si possible, la concentration par analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique.

- Concentrations à utiliser:
1,0; 3,2; 5,6; 10,0 et 32,0 mg/l, bissection progressive des intervalles sur une échelle logarithmique plus un témoin (contrôle).
Si on a aucune idée de la toxicité du polluant, préparer une expérience préliminaire (ou générale) avec de larges écarts de concentrations, par exemple: 1 000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 0,25; 0,10 mg/l (on peut supprimer certaines concentrations plus faibles, etc ..); plus un lot témoin (contrôle). Cette expérience achevée, on choisira les concentrations pour le bioessai réel.

- Préparation des concentrations:
les concentrations pour les bioessais seront faites dans des bonbonnes de verre de 10 l, à partir de la solution à 1 000 mg/l de cadmium.
Les solutions de cadmium doivent être préparées comme suit:

| Concentration finale mg/l | ml de la solution-mère à 1 000 mg/l | |
|---|---|---|
| 32,0 | 320 | |
| 10,0 | 100 | Ajuster à 10 litres |
| 5,6 | 56 | avec de l'eau de mer |
| 3,2 | 32 | |
| 1,0 | 10 | |

Prévoir un "témoin" avec de l'eau de mer pure (sans chlorure de cadmium).

- Source d'eau de mer:
eau de mer artificielle ou naturelle. L'eau de mer naturelle doit provenir d'une zone non contaminée par la pollution et être filtrée sur membrane de 0,45 µ. Ajuster, éventuellement, la salinité.

- Température: doit être notée chaque jour, être constante, ne pas dépasser 20°C si possible.

- Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

- Nourriture: pas de nourriture.

- Récipients expérimentaux:
bocaux de verre de 500 ml avec un couvercle. Tous les bocaux seront rincés à l'acide nitrique dilué, puis avec de l'eau désionisée ou de l'eau de mer filtrée (pas d'eau courante). On marquera sur chaque bocal la concentration correspondante.

- Protocole expérimental:

1) Placer les Idotea provenant des stocks en stabulation dans de grands cristallisoirs en verre préalablement lavés à l'acide nitrique et rincés avec de l'eau désionisée ou de l'eau de mer filtrée (pas d'eau courante). Ajouter des débris de feuilles de posidonies ou morceaux de Codium séché. On choisira des animaux adultes jeunes.

2) Transférer l'isopode dans un bocal contenant de l'eau de mer convenable. Plusieurs isopodes peuvent être réunis dans le même bocal si l'on a soin d'y ajouter posidonies ou Codium.

3) Examiner chaque animal à la loupe binoculaire. Ecarter tous les individus blessés ainsi que les femelles incubantes.

4) Utiliser 20 individus de même sexe par concentration. 1 Idotea par bocal donnera 20 bocaux par concentration. Remplir les bocaux avec 450 ml de la solution correspondant à la concentration choisie (450 ml d'eau de mer pour les témoins). Une distribution au hasard ("random") des individus dans les récipients est souhaitable.

5) Durée de l'expérience: 96 heures.

6) Observations au bout de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h. Pas de renouvellement du milieu expérimental.
La mort de l'Idotea est définie par l'absence de réaction lorsqu'on touche les pléopodes avec une aiguille montée, ou un tube de verre effilé. La première piqûre sera légère et la seconde, accentuée, suivra si l'animal ne réagit pas.

## 4.7 Test de mortalité à court terme avec la crevette Palaemon elegans

- Espèce: Palaemon elegans (taille des individus: environ 2 à 3 cm).

- Polluant: chlorure de cadmium

- Solution de départ: à 1 000 mg/l de cadmium dans l'eau désionisée.

- Préparation de la solution de départ (solution-mère):
dissoudre 16,3 g de chlorure de cadmium dans 10 litres d'eau de mer désionisée. Vérifier, si possible, la concentration par analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique.

- Concentrations à utiliser:
1,0; 3,2; 5,6; 10,0; 32,0 et 56,0 mg/l; bissection progressive des intervalles sur une échelle logarithmique plus un témoin. Si l'on ignore totalement la toxicité du produit, il est nécessaire de procéder, au préalable, à une expérience préliminaire (ou expérience générale) avec de larges écarts de concentration: 1 000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0,25 et 0,10 mg/l plus un témoin.

- Préparation des concentrations:
les concentrations pour les bioessais seront faites dans des bonbonnes de verre de 10 l à partir de la solution à 1 000 mg/l de cadmium. Les solutions de cadmium seront préparées comme suit:

| Concentration finale mg/l | ml de la solution-mère à 1 000 mg/l | |
|---|---|---|
| 56,0 | 560,0 | |
| 32,0 | 320,0 | |
| 10,0 | 100,0 | Ajuster à 10 litres |
| 5,6 | 56,0 | avec de l'eau de mer |
| 3,2 | 32,0 | |
| 1,0 | 10,0 | |

Prévoir un "témoin" avec de l'eau de mer pure (sans chlorure de cadmium).

- Source d'eau de mer:
eau de mer artificielle ou naturelle. L'eau de mer naturelle doit provenir d'une zone non contaminée par la pollution et être filtrée sur membranes de 0,45 µ. Ajuster, éventuellement, la salinité. Bien aérer l'eau afin d'obtenir une saturation maximum en oxygène.

- Température: doit être notée chaque jour, être constante, ne pas dépasser 20°C si possible.

- Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

- Nourriture: pas de nourriture.

- Récipients:
récipients en polystyrène ou en verre de 5 l, avec un couvercle. Tous les bocaux seront rincés à l'acide nitrique dilué, puis avec de l'eau désionisée ou de l'eau de mer filtrée (pas d'eau courante). On marquera sur chaque bocal la concentration correspondante.

- Protocole expérimental:

1) Placer les Palaemon provenant des stocks en stabulation dans de grands cristallisoirs en verre préalablement lavés à l'acide nitrique et rincés.

2) Transférer chaque crevette dans un petit cristallisoir contenant de l'eau de mer convenable.

3) Examiner chaque animal à la loupe binoculaire. Ecarter tous les individus blessés ainsi que les femelles incubantes.

4) Utiliser 20 individus par concentration. Un Palaemon par récipient donnera 20 récipients par concentration. Remplir les récipients avec 4 l de la solution correspondant à la concentration choisie (4 l d'eau de mer pour les témoins). Une distribution au hasard ("random") des individus dans les récipients est souhaitable. Vérifier périodiquement la concentration en oxygène dissous. Procéder, éventuellement, à une arrivée d'air, faible et de courte durée, par bulleur si la concentration en oxygène dissous baisse de 25 à 30 %.

5) Durée de l'expérience: 96 heures.

6) Observations au bout de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h. Pas de renouvellement du milieu expérimental.
La mort de Palaemon est définie comme l'absence de réaction lorsqu'on touche les pléopodes avec une aiguille montée ou un tube de verre effilé. La première piqûre sera légère et la seconde, accentuée, suivra si l'animal ne réagit pas.

4.8 Test de mortalité à court terme avec le poisson Mugil auratus

- Espèce: Mugil auratus (taille des individus: environ 5 à 7 cm).

- Polluant: chlorure de cadmium

- Solution de départ: à 1 000 mg/l de cadmium dans l'eau désionisée.

- Préparation de la solution de départ (solution-mère):
dissoudre 16,3 g de chlorure de cadmium dans 10 litres d'eau de mer désionisée. Vérifier, si possible, la concentration par analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique.

- Concentrations à utiliser:
1,0; 3,2; 5,6; 10,0; 32,0 et 56,0 mg/l; bissection progressive des intervalles sur une échelle logarithmique plus un témoin. Si l'on ignore totalement la toxicité du produit, il est nécessaire de procéder, au préalable, à une expérience préliminaire (ou expérience générale) avec de larges écarts de concentration: 1 000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0,25 et 0,10 mg/l plus un témoin.

- Préparation des concentrations:
les concentrations pour les bioessais seront faites dans des bonbonnes de verre de 10 l à partir de la solution à 1 000 mg/l de cadmium. Les solutions de cadmium seront préparées comme suit:

| Concentration finale mg/l | ml de la solution-mère à 1 000 mg/l | |
|---|---|---|
| 56,0 | 560,0 | |
| 32,0 | 320,0 | |
| 10,0 | 100,0 | Ajuster à 10 litres |
| 5,6 | 56,0 | avec de l'eau de mer |
| 3,2 | 32,0 | |
| 1,0 | 10,0 | |

Prévoir un "témoin" avec de l'eau de mer pure (sans chlorure de cadmium).

- Source d'eau de mer:
eau de mer artificielle ou naturelle. L'eau de mer naturelle doit provenir d'une zone non contaminée par la pollution et être filtrée sur membranes de 0,45 µ. Ajuster, éventuellement, la salinité. Bien aérer l'eau afin d'obtenir une saturation maximum en oxygène.

- Température: doit être relevée chaque jour, être constante, ne pas dépasser 20°C si possible.

- Lumière: cycle jour/nuit de 12 heures.

- Nourriture: pas de nourriture.

- Récipients:
récipients en polystyrène ou en verre de 15 l, avec un couvercle. Tous les bocaux seront rincés à l'acide nitrique dilué, puis avec de l'eau désionisée ou de l'eau de mer filtrée (pas d'eau courante). On marquera sur chaque bocal la concentration correspondante.

- Protocole expérimental:

1) Placer les Mugil provenant des stocks en stabulation dans de grands cristallisoirs en verre préalablement lavés à l'acide nitrique et rincés.

2) Transférer chaque poisson dans un petit cristallisoir contenant de l'eau de mer convenable.

3) Examiner chaque animal à la loupe binoculaire. Ecarter tous les individus blessés.

4) Utiliser 20 individus par concentration. Un Mugil par récipient donnera 20 récipients par concentration. Remplir les récipients avec 10 l de la solution correspondant à la concentration choisie (10 l d'eau de mer pour les témoins).
Une distribution au hasard ("random") des individus dans les récipients est souhaitable. Vérifier périodiquement la concentration en oxygène dissous. Procéder, éventuellement, à une arrivée d'air, faible et de courte durée, par bulleur si la concentration en oxygène dissous baisse de 25 à 30 %.

5) Durée de l'expérience: 96 heures.

6) Observations au bout de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h. Pas de renouvellement du milieu expérimental.
La mort de Mugil est définie comme l'absence de réaction lorsqu'on touche les branchies et le museau avec une aiguille montée ou un tube de verre effilé. La première piqûre sera légère et la seconde, accentuée, suivra si l'animal ne réagit pas.

## 5. EVALUATION ET PRESENTATION DES RESULTATS

L'évaluation des résultats expérimentaux a fait l'objet d'innombrables études qui ont abouti à la mise au point de diverses méthodes.

Nous suggérons de limiter les tests statistiques employés à ceux répertoriés, décrits et critiqués dans l'ouvrage suivant, édité par la FAO et disponible uniquement en anglais: "Manual of methods in aquatic environment research. Part 5 - Statistical tests" (par F. Müller, FAO Fisheries Technical Paper No. 182, Rome 1979).

La présentation des résultats obtenus peut toujours être réalisée à l'aide de tableaux donnant pour les bioessais basés sur la léthalité, les pourcentages cumulés de morts et pour chaque concentration à chacun des temps d'observation. Toutefois, il est le plus souvent préférable de présenter des résultats expérimentaux sous une forme codifiée et largement admise (par exemple: temps léthal, concentration léthale).

Dans ce Manuel, on propose d'utiliser la notion de concentration léthale 50 %(et ses dérivés concentration léthale 10 %, concentration léthale 90 %).

Les concentrations pourront être obtenues sous une forme précise (et dont on connaîtra les limites de confiance) en utilisant la méthode des probits (Bliss, 1935) et ses dérivés.

La méthode de Bliss appliquée aux invertébrés marins (Stora, 1972) sera préconisée pour exprimer les résultats observés au cours des différents bioessais basés sur la léthalité. Cette méthode de calcul est détaillée dans le paragraphe 5.1.

Pour ce qui est du test à long terme avec Tisbe bulbisetosa qui n'est pas un test de mortalité, il est suggéré d'appliquer le test de Kolmogoroff-Smirnov pour calculer la significativité des résultats (Cf. 5.2). On se référera aussi à l'ouvrage de Müller (1979), page 40 et 41, tableau A-7 page 106.

### 5.1 La méthode de Bliss

Le traitement statistique des données expérimentales effectué par la méthode des probits de Bliss (1935), modifiée par Bliss (1938), pour des expériences utilisant un nombre réduit d'animaux-tests est particulièrement bien adapté aux recherches menées sur des invertébrés marins.

Cette méthode part de l'hypothèse que, dans la relation "effets-doses", les effets proportionnels aux logarithmes des concentrations sont normalement distribués. Si l'on porte sur un graphique les pourcentages de mortalité observés en un temps choisi en fonction des logarithmes de concentrations, on obtient une courbe sigmoïde intégrale de la courbe de Gauss. Cette courbe se prête mal au calcul; le changement des pourcentages de mortalité en probits transforme cette courbe sigmoïde en droite.

La méthode de calcul donnée par Bliss, ayant une variation linéaire des probits de mortalité en fonction des logarithmes de concentrations utilisés, consiste en l'établissement d'une droite de régression de la forme: $Y = \bar{y} + b\,(X-\bar{x})$ et présente de nombreux avantages.

- Elle permet d'une part, l'emploi d'un nombre réduit d'animaux-tests car il est le plus souvent difficile au sein d'un écosystème, de rassembler un grand nombre d'individus d'une même espèce. D'autre part, le nombre d'animaux utilisés par concentration peut être variable, ce qui rend la méthode de Bliss particulièrement intéressante pour l'étude de la sensibilité d'espèces coloniales difficilement fractionnables en lots égaux.

- Il n'est pas rare pour des espèces prélevées de leur biotope et placées dans des conditions de vie artificielle, malgré une période de stabulation destinée à limiter les effets du stress occasionné par le prélèvement, d'observer dans les solutions témoins sans altéragènes, la mort de quelques individus. On peut tenir compte dans le calcul de la droite de régression, dans une certaine limite, d'une mortalité naturelle des animaux sans que celle-ci n'entraîne le rejet des données de l'expérience.

- Le test du $\chi^2$ employé dans la méthode de Bliss permet de vérifier la légitimité de l'ajustement linéaire. Comme le rappellent Lazar et Lellouch (1969), par ce test du $\chi^2$, il ne s'agit pas de démontrer que la courbe de régression de l'effet sur la dose est une droite, mais seulement que les données expérimentales ne permettent pas de rejeter cette hypothèse qui a l'avantage de simplifier la recherche des concentrations léthales.

Si le test du $\chi^2$ est significatif, il est possible que l'espèce utilisée présente en fonction des concentrations d'un altéragène des mortalités qui ne se rapprochent pas d'une distribution gaussienne. Mais un test significatif peut être lié à l'hétérogénéité de la population testée ou tout simplement à une erreur de manipulation. Le calcul du $\chi^2$ permet d'apprécier le bon déroulement de l'expérimentation.

- A partir de l'équation de la droite de régression calculée, on peut obtenir pour n'importe quel pourcentage de morts choisis (à l'exception de 0 et 100 %) la concentration léthale correspondante et son intervalle de confiance.

5.1.1 Calcul

a) Transformation des concentrations

Pour des concentrations inférieures à 1, on ajoute selon les cas, une ou plusieurs unités aux logarithmes calculés pour éviter les valeurs négatives ou on change l'unité de mesure (de g à mg, de mg à µg).

b) Transformation du nombre de morts en pourcentage

Correction des pourcentages de mortalités tenant compte de la mortalité naturelle

Il peut arriver d'observer une mortalité dite naturelle chez les témoins. Si le pourcentage de mortalité naturelle n'excède pas 20 %, on procède à la correction des mortalités dues aux concentrations utilisées par la formule d'Abbot (1925):

$$\% \text{ de mortalités corrigées} = \frac{P_o - P_t}{100 - P_t}$$

$P_o$ = Pourcentage de mortalités observées.

$P_t$ = Pourcentage de mortalités chez les témoins.

c) Etablissement des probits empiriques

A chaque pourcentage de mortalité correspond une valeur de probit appelé probit empirique, lue dans les tables.

d) Tracé de la droite provisoire

On porte sur un graphique les probits empiriques en fonction des logarithmes des concentrations. On a un ensemble de points plus ou moins alignés. On trace la droite la mieux ajustée aux points obtenus.

e) Estimation des probits probables

La droite obtenue est de la forme $y' = a' + b'x$. On cherche l'équation de cette droite en prenant les coordonnées de 2 points de cette droite. Pour l'équation calculée, les valeurs y' correspondant aux logarithmes des concentrations, sont appelées probits probables. Il est à noter que les probits probables peuvent être lus directement sur la droite provisoire en fonction des logarithmes des concentrations.

Il est à noter que la recherche de l'équation de la droite provisoire et le calcul des probits probables peut se faire sur un calculateur programmable.

f) Calcul des probits corrigés

Pour des raisons théoriques complexes, on ne peut calculer l'équation de la droite de régression à partir des probits probables. On calcule des probits corrigés y.

Si $y' \geqslant 5$ $\qquad y = (Y + \frac{Q}{Z}) - q\,(\frac{1}{Z})$

Si $y' < 5$ $\qquad y = (Y - \frac{P}{Z}) + p\,(\frac{1}{Z})$

$(Y + \frac{Q}{Z})$, $(Y - \frac{P}{Z})$ et $(\frac{1}{Z})$ sont des paramètres dont les valeurs sont calculées dans les tables de Bliss en fonction des probits probables.

p représente le pourcentage de morts et q représente le pourcentage de vivants (exprimé avec un nombre décimal ex. 20 % = 0,2).

g) Pondération des probits

Chaque probit corrigé est lié à un coefficient de pondération, $w = N\,(\frac{Z^2}{PQ})$ où N représente le nombre d'animaux mis en expérience, $\frac{Z^2}{PQ}$ est lue dans les tables en fonction des probits probables.

h) Calcul de la droite de régression

Le calcul de la droite de régression se fait à partir des logarithmes des concentrations x et des probits corrigés y affectés de leur coefficient de pondération.

L'équation de la droite de régression est de la forme: $Y = \bar{y} + b\,(X - \bar{x})$ où

$$\bar{y} = \frac{S(wy)}{S(w)} \qquad \bar{x} = \frac{S(wx)}{S(w)} \qquad b = \frac{S(wxy) - \bar{y}\,S(wx)}{S(wx^2) - \bar{x}\,S(wx)} \qquad S = \text{somme}$$

De l'équation de la droite de régression on tire la valeur X:

$$X = \bar{x} + \frac{1}{b} ( Y - \bar{y})$$

Pour 50 % de morts Y = 5, la CL50 recherchée sera égale à:

$$X = \log CL50 = \bar{x} + \frac{1}{b} (5 - \bar{y})$$

i) Test de linéarité de la droite de régression

Pour cela, on utilise le test du $\chi^2$ calculé par la formule suivante:

$$\chi^2 = \left[S(wy^2) - \bar{y}\, S(wy)\right] - b\left[S(wxy) - \bar{y}\, S(wx)\right]$$

La valeur trouvée est comparée à celle lue dans le tableau de $\chi^2$ (Müller 1979, p. 102, Tableau A 5) pour un nombre de degrés de liberté égal à n - 2, n représentant le nombre de concentrations mises en expérience. Dans la mesure où le test du $\chi^2$ n'infirme pas l'hypothèse de travail, c'est-à-dire si la valeur lue dans la table est supérieure à la valeur calculée pour un coefficient de sécurité de 95 %, on peut conclure à la linéarité de la droite et à l'homogénéité de la population testée.

j) Calcul de la variance et de l'écart type de la CL50

Le test du $\chi^2$ étant satisfaisant, on calcule la variance de la Cl50 donnée par l'expression:

$$V(X) = \frac{V(b)\ (Y - a\ )^2 + V(a)\ b^2}{b^4} \qquad \text{où}$$

$$a = \bar{y} \qquad V(a) = \frac{1}{S(w)} \qquad V(b) = \frac{1}{S(wx^2) - \bar{x}\, S(wx)}$$

Pour la CL50, la variance peut être calculée directement par l'équation:

$$V\ (\log.\ CL50) = (\frac{1}{b})^2 \left[(\frac{1}{b}) \frac{(Y - \bar{y})^2}{S(wxy) - \bar{y}\, S(wx)} + \frac{1}{S(w)}\right]$$

et son écart type: $\sigma = \sqrt{V(X)}$
Les limites de la CL50 sont égales à $\pm$ 2$\sigma$
Ce qui donne comme limites supérieures et inférieures en logarithmes:

log. (limite supérieure) = log CL50 + 2$\sigma$
log. (limite inférieure) = log CL50 - 2$\sigma$

On convertit les valeurs logarithmiques et on obtient la CL50 et ses limites de confiance:

$$CL50 \pm \frac{\text{limite supérieure - limite inférieure}}{2}$$

k) Calcul de la CL90

A partir de l'équation de la droite de régression, on peut calculer n'importe quelle concentration léthale. Pour la CL90 par exemple, la valeur Y du probit correspondant à 90 % de morts est égale à 6,2816.

$$\log. \text{CL90} = \bar{x} + \frac{1}{b} (6{,}2816 - \bar{y})$$

Le calcul de la variance s'effectue de la même façon en remplaçant Y = 5 pour 50 % de morts par Y = 6,2816.

l) Exemple numérique

Le tableau II présente un exemple numérique du calcul de la CL50 48 h, par la méthode de Bliss.

## Tableau II

Calcul de la CL50 48 h par la méthode de Bliss de Scolelepis fuliginosa en présence d'un détergent non-ionique oxyéthylène nonyl phénol

| mg/l | Mortalité | % | Log concentration | Probits empiriques | Probits probables | Probits corrigés | $\frac{Z^2}{PQ}$ | w | wx | wy | wxy | $wx^2$ | $wy^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 0 | 0 | 0.60206 | — | 3.32 | 2.8420 | 0.2136 | 4.2720 | 2.5720 | 12.1410 | 7.3096 | 1.5485 | 34.5047 |
| 5 | 4 | 20 | 0.69897 | 4.1584 | 4.03 | 4.1673 | 0.4484 | 8.9680 | 6.2683 | 37.3723 | 26.1218 | 4.3813 | 155.7415 |
| 6 | 6 | 30 | 0.77815 | 4.4756 | 4.63 | 4.4803 | 0.6051 | 12.1020 | 9.4171 | 54.2205 | 42.1914 | 7.3279 | 242.9241 |
| 7 | 11 | 55 | 0.84510 | 5.1257 | 5.12 | 5.1255 | 0.6329 | 12.6580 | 10.6972 | 64.8785 | 54.8284 | 9.0402 | 332.5347 |
| 8 | 15 | 75 | 0.90309 | 5.6745 | 5.56 | 5.6701 | 0.5671 | 11.3420 | 10.2428 | 64.3102 | 58.0777 | 9.2501 | 364.6452 |
| 9 | 16 | 80 | 0.95424 | 5.8416 | 5.93 | 5.8371 | 0.4615 | 9.2300 | 8.8076 | 53.8764 | 51.4108 | 8.4045 | 314.4819 |
| 10 | 20 | 100 | 1 | — | 6.28 | 6.8506 | 0.3427 | 6.8540 | 6.8540 | 46.9540 | 46.9540 | 6.8540 | 321.6630 |
| | | | | | | | | S(w) | S(wx) | S(wy) | S(wxy) | $S(wx^2)$ | $S(wy^2)$ |
| | | | | | | | | 65.4260 | 54.8590 | 333.7529 | 286.8937 | 46.8064 | 1766.4951 |

Courbe provisoire: $y' = -1.14 + 7.42\,x$

$\bar{x} = 0.83848$

$\bar{y} = 5.10122$

$S(wx^2) - \bar{x}\,S(wx) = 0.8083$

$S(wxy) - \bar{y}\,S(wx) = 7.0459$

$S(wy^2) - y\,S(wy) = 63.9528$

$b = 8.7169$

$\chi^2 = 2.53$

log. CL50 = 0.82687

V (log. CL50) = 0.000203

log. CL90 = 0.97383

V (log. CL90) = 0.000446

5.2 Test de Kolmogoroff-Smirnov

a) On peut utiliser le test de Kolmogoroff-Smirnov pour calculer la significativité des résultats du test à long terme avec Tisbe bulbisetosa soumis à l'action d'un hydrocarbure par rapport à un contrôle.

L'hypothèse nulle qui suppose que le paramètre étudié n'a pas réellement varié d'un échantillon à l'autre, peut être vérifiée avec le test de Kolmogoroff-Smirnov (Kolmogoroff, 1941; Smirnov, 1948) pour des variations continues ou pour des prélèvements avec plus de 5 observations.

$$\lambda(1-\alpha)\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$$

avec $\lambda(1-\alpha)$ donné par Stange et Henning (1966), à la suite de Smirnov (1948)

| $1-\alpha$ | 0,95 | 0,975 | 0,99 | 0,995 |
|---|---|---|---|---|
| $\lambda(1-\alpha)$ | 1,36 | 1,48 | 1,63 | 1,73 |

b) Exemple numérique pour l'application du test de Kolmogoroff-Smirnov

| Nombre de nauplii | Concentration 4.2 mg/l hydrocarbures de pétrole | | Contrôle eau de mer | | Différences des fréquences cumulées* |
|---|---|---|---|---|---|
| 1er sac | Nombre ♀♀ | Fréquences cumulées | Nombre ♀♀ | Fréquences cumulées | |
| 0-10 | 2 | 0.11 | 2 | 0.10 | 0.01 |
| 10-20 | 2 | 0.21 | 4 | 0.30 | 0.09 |
| 20-30 | 5 | 0.47 | 4 | 0.50 | 0.03 |
| 30-40 | 6 | 0.79 | 4 | 0.70 | 0.09 |
| 40-50 | 4 | 1.00 | 4 | 0.90 | 0.10 |
| 50-60 | - | 1.00 | 1 | 0.95 | 0.05 |
| 60-70 | - | 1.00 | 1 | 1.00 | 0 |
| | 19 | | 20 | | |

$D_{19,20} = 0.10$ Différence maximum entre les fréquences cumulées

Valeur critique à 95 % $= 1.36\sqrt{\frac{19 + 20}{19 \times 20}} = 1.36\sqrt{\frac{39}{380}}$

$= 1.36 \times 0.32 = 0.44$

$0.10 < 0.44$ d'où ce n'est pas significatif.

* sans considérer le signe, c'est-à-dire /0/ en valeur absolue.

## 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Abbot, W.S., A method of computing effectiveness of an insecticid.
1925 J.Econ.Entomol., 18:265-7

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution
1976 Control Federation, Standards methods for the examination of water and waste water. Washington, D.C., American Public Health Association, 1193 p. 14th ed.

Bliss, C.I., The calculation of the dosage mortality curve. Ann.Appl.Biol., 22:134-67
1935

·, The determination of the dosage mortality curve from small numbers.
1938 Q.J.Pharmacol., 11:192-216

Dalla Venezia, L. et V.U. Fossato, Characteristics of suspensions of Kuwait oil and
1977 Corexit 7664 and their short and long-term effects on Tisbe bulbisetosa (Copepoda, Harpacticoïda). Mar.Biol., 42:233-7

FAO, Manuel des méthodes de recherche sur l'environnement aquatique. 4ème partie:
1981 Principes de sélection des tests biologiques pour l'évaluation de la pollution marine. FAO Doc.Tech.Pêches, (164):33 p.

Fauvel, P., Polychètes sédentaires. Faune Fr., 16:154-5
1927

Fischer, W. (ed.), Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche,
1973 Méditerranée et Mer Noire (Zone de pêche 37). Rome, FAO, 2 vols, Codes: MYTIL Mytil 1, 1972 and MUGIL Mugil 5, 1971.

Kolmogoroff, A., Confidence limits for an unknown distribution function. Ann.Math.Statist.,
1941 12:461-3

Lazar P. et J. Lellouch, Cours de statistique appliquée à la biologie. 1ère partie: les
1969 essais biologiques. C.E.S.A.M. STAB, 18, MESU 1, ronéot. p., Paris.

Möller, F., Manual of methods in aquatic environment research. Part 5. Statistical tests.
1979 FAO Fish.Tech.Pap., (182):131 p.

Reish D.J. et al., Intercalibratory calibration experiments using the Polychaetous Annelid
1978 Capitella capitata. Mar.Environ.Res., 1:109-18

Smirnov, N., Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions. Ann.Math.
1948 Statist., 19:279-81

Stange, K. et H.J. Henning, Graf/Henning/Stange Formeln und Tabellen der Mathematischen
1966 Statistik. Berlin, Springer, 362 p.

Stora, G., Contribution à l'étude de la notion de concentration léthale limite moyenne
1972 (CL50) appliquée à des invertébrés marins. 1. Etude méthodologique. Téthys, 4(3):597-644

Tinturier-Hamelin, E., 1963 Etude du polychromatisme chez Idotea balthica Pallas (isopode valvifère). Cah.Biol.Mar., 4(5):499-500

Volkmann Rocco, B., 1972 Species of Tisbe (Copepoda, Harpacticoïda) from Beaufort, North Carolina. Arch.Oceanogr.Limnol., 17(3):223-73

Zariquiey Alvarez, R., 1968 Crustáceos decápodos ibéricos. Invest.Pesq., Barc., 32:510p.

MANUAL OF METHODS IN AQUATIC ENVIRONMENT RESEARCH
MANUEL DE METHODES DE RECHERCHE SUR L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE
MANUAL DE METODOS DE INVESTIGACION DEL MEDIO AMBIENTE ACUATICO

Part 1: Methods for Detection, Measurement and Monitoring of Water Pollution. 1975. FAO Fish.Tech.Pap., (137):238 p.

Part 2: Guidelines for the Use of Biological Accumulators in Marine Pollution Monitoring, edited by J. Portmann. 1976, FAO Fish.Tech.Pap., (150):76 p.

Part 3: Sampling and Analyses of Biological Material. (Guidelines for the FAO(GFCM)/UNEP Joint Coordinated Project on Pollution in the Mediterranean), by M. Bernhard. 1976. FAO Fish.Tech.Pap., (158):124 p.

Echantillonage et analyse du matériel biologique. (Directives destinées au projet commun coordonné FAO(CGPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée), par M. Bernhard. 1977. FAO Doc.Tech.Pêches, (158):132 p.

Part 4: Bases for Selecting Biological Tests to Evaluate Marine Pollution. 1977. FAO Fish.Tech.Pap., (164):31 p.

Principes de sélection des tests biologiques pour l'évaluation de la pollution marine. 1981. FAO Doc.Tech.Pêches, (164):32 p.

Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. 1981. FAO, Doc.Téc.Pesca, (164):34 p.

Part 5: Statistical Tests, by F. Möller. 1979. FAO Fish.Tech.Pap., (182):131 p.

Part 6: Toxicity Tests. FAO Fish.Tech.Pap., (185), in preparation

Part 7: Selected Bioassays for the Mediterranean. (Tests used by the FAO(GFCM)/UNEP Joint Coordinated Project on Pollution in the Mediterranean), by G. Bellan. 1981. FAO Fish.Tech.Pap., (208), in preparation

Bioessais sélectionnés pour la Méditerranée. (Tests utilisés dans le Projet commun coordonné FAO(CGPM)/PNUE sur la pollution en Méditerranée) par G. Bellan. 1981. FAO Doc.Tech.Pêches, (208), 37 p.

Part 8: Ecological Assessment of Pollution Effects (Guidelines for the FAO(GFCM)/UNEP Joint Coordinated Project on Pollution in the Mediterranean), by J. Stirn. 1981. FAO Fish.Tech.Pap., (209), in preparation

Part 9: Analyses of Metals and Organochlorines in Fish. FAO Fish.Tech.Pap., (212), in preparation

NO: 11236

$$\frac{37 + 15}{52}$$